

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. März 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/19961 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 5/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/03140

(22) Internationales Anmeldedatum:
11. September 2000 (11.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 43 517.0 11. September 1999 (11.09.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): UNIVERSITÄTSKLINIKUM DER RHEINISCH-WESTFÄLISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE AACHEN [DE/DE]; Pauwelsestrasse 30, 52074 Aachen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VON HEIMBURG, Dennis [DE/DE]; Theresienstrasse 18, 52072 Aachen (DE).

(74) Anwalt: KÖNIG, Werner, E.; König & Kollegen, Habsburgerallee 23-25, 52064 Aachen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR CULTIVATING LIVING CELLS, ESPECIALLY MATURE FAT CELLS, WHICH ARE PREPARED FROM TISSUE AND FLOAT IN LIQUIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR KULTIVIERUNG VON AUS GEWEBE PRÄPARIERTEN LEBENDEN ZELLEN, DIE IN FLÜSSIGKEIT AUFSCHWIMMEN, INSBESONDERE REIFEN FETTZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to methods for cultivating living cells, especially mature fat cells, which are prepared from tissue and float in liquids. The cells, together with a liquid adhering medium acting as a distribution aid, are first mounted to the cell culture base of a cell culture basin. The cells mechanically adhere to said base with increasing evaporation of the adhering medium. The adhering medium is subsequently added to the cells as an additional layer. The cells are stored under standard conditions for cell cultures for at least 12 hours, while at least some cells biologically adhere to the cell culture base. A technically simple and cost-effective method for cultivating cells on cell culture bases resulting in a high yield is thus provided with the aid of cell culture basins. The basis of, metabolic examinations for instance, in the pharmaceutical industry is provided by in-vitro cultivating individual cells according to the invention. Complicated and ethically dubious animal experiments are thus prevented or at least reduced to a minimum.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Kultivierung von aus Gewebe präparierten lebenden Zellen, die in Flüssigkeit aufschwimmen, insbesondere reifen Fettzellen, wobei die Zellen zuerst zusammen mit einem flüssigen Anheftmedium als Verteilungshilfe auf den Zellkulturboden einer Zellkulturschale aufgebracht werden, an dem sie mit zunehmender Verdunstung des Anheftmediums mechanisch anhaften und dann die Zellen mit dem Anheftmedium überschichtet und mindestens 12 h bei Standardbedingungen für Zellkulturen gelagert werden, währenddessen sich zumindest einige Zellen biologisch auf dem Zellkulturboden anheften. Hierdurch wird unter Zuhilfenahme von Zellkulturschalen ein technisch einfaches und preiswertes Verfahren zur Kultivierung von Zellen auf Zellkulturböden mit einer hohen Ausbeute geschaffen. Durch diese in-vitro-Kultivierung einzelner Zellen wird die Basis z.B. für Stoffwechseluntersuchungen in der pharmazeutischen Industrie gebildet. Aufwendige und ethisch bedenkliche Tierversuche werden somit vermieden oder zumindest auf ein Minimum begrenzt.

WO 01/19961 A2

Verfahren zur Kultivierung von aus Gewebe präparierten lebenden Zellen, die in Flüssigkeit aufschwimmen, insbesondere reifen Fettzellen

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Kultivierung von aus Gewebe präparierten lebenden Zellen, die in Flüssigkeit aufschwimmen, insbesondere reifen Fettzellen.

10

Aus Sugihara H. et al. „Primary culture of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and change in differentiation properties“, Zeitschrift Differentiation, 31, S. 42-49 (1986) ist bekannt, Fettgewebszellen durch eine Deckenkulturmethode (ceiling-culture-method) zu kultivieren. Dabei werden die aufbereiteten Zellen, d.h., die durch Enzyme aus dem Zellverband gelösten Zellen, in einem Medium suspendiert und in eine Kulturflasche gegeben. Die Kulturflasche verfügt über einen präparierten Wandungsbereich, der in der Aufbereitung der Oberfläche von Kulturböden herkömmlicher Zellkulturschalen entspricht. Die Kulturflasche wird derart gelegt, daß der präparierte Wandungsbereich nach oben zeigt. Dadurch stellt der präparierte Wandungsbereich in dieser Lage den am höchsten gelegenen Bereich der Flasche dar, d.h., er wird dadurch zu einer Kulturdecke. Die im Medium an der Oberfläche schwimmenden reifen Fettzellen (Adipozyten) heften sich an dieser Kulturdecke an. Ohne diese Anheftung kann es nicht zu einer Zellteilung kommen. Nach erfolgter Anheftung nach ca. 24 bis 48 h wird die Flasche um 180° um ihre Längsachse gedreht, so dass aus der Kulturdecke ein Kulturboden wird. Die angehefteten Fettzellen können nun delipidieren. Nachteilig an diesem Verfahren ist, dass durch die Verwendung von Flaschen mit einem Bedarf von 5,3 ml Medium pro cm² Kulturboden ein hoher Verbrauch an Medium entsteht. Zudem wird durch die geschlossene Flasche ein CO₂-Austausch verhindert, so dass der pH-Wert der Lösung nicht aufrecht erhalten werden kann. Durch den Flaschenverschluss kommt es während der Drehmanöver häufig zu Infektionen mit nachfolgendem Verlust der Zellen. Zudem ist das Verfahren kosten- und arbeitsaufwendig.

30

Die Aufgabe der Erfindung besteht nun darin, ein einfaches Verfahren zur Kultivierung von aus Gewebe präparierten lebenden Zellen, die in Flüssigkeit aufschwimmen, insbesondere reifen Fettzellen (Adipozyten), auf Zellkulturböden zu schaffen, mit einer möglichst hohen Ausbeute an Zellen unter zu Hilfenahme von Zellkulturschalen.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, dass die Zellen zuerst zusammen mit einem flüssigen Anheftmedium als Verteilungshilfe auf den Zellkulturboden einer Zellkulturschale aufgebracht werden, an dem sie mit zunehmender Verdunstung des Anheftmediums mechanisch anhaften, und dass dann die Zellen mit dem Anheftmedium überschichtet und mindestens 12 h bei Standardbedingungen für Zellkulturen gelagert werden, währenddessen sich zumindest einige Zellen biologisch auf dem Zellkulturboden anheften, d.h. mittels neu gebildeter Zellausläufer („Anheftfüßchen“) am Boden verankern.

Durch diese in-vitro-Kultivierung einzelner Zellen wird die Basis z.B. für Stoffwechseluntersuchungen in der pharmazeutischen Industrie gebildet. Nach dem Anheften an den Zellkulturboden können die einzelnen Zellen am Leben erhalten werden und individuell, z.B. durch Zugabe von Insulin, manipuliert werden. Hierzu müssen den Probanden jeweils nur kleinste Mengen Gewebe, z.B. verfettete Leberzellen, entnommen und diese kultiviert werden. Aufwendige und ethisch bedenkliche Tierversuche werden somit vermieden oder zumindest auf ein Minimum begrenzt.

Erfindungsgemäß kann ferner vorgesehen sein, dass vor dem Überschichten mit dem Anheftmedium die Zellen mit einer perforierten Membran überdeckt werden. Dies fördert das Anheften der Zellen auf dem Zellkulturboden.

Weiterhin ist vorstellbar, im Anschluss an die Lagerung bei Standardbedingungen für Zellkulturen das Anheftmedium zu entfernen und die Kulturschale mit einem Promotionsmedium mehrtägig zu überschichten, währenddessen zumindest einige Zellen delipidieren und sich teilen (Mitose). Hierdurch können Zellen gezielt gezüchtet werden. Nach mehreren Teilungen ist eine sogenannte Monolayer-Zellkultur entstanden, d.h., die Zellen bilden einen zweidimensionalen Zellrasen auf der Kulturplatte

aus. Diese Zellen können nun viele Teilungen durchführen. Somit kann aus einer nur geringen, z.B. erbsengroßen Menge Gewebe durch mehrfache Teilung ein Vielfaches der Ausgangszellanzahl gewonnen werden. Diese Zellen können z.B. für aufwendige pharmazeutische Versuchsreihen für die Erprobung von Arzneimitteln Verwendung finden oder aber auch im Bereich der Gewebezüchtung zum späteren Einsatz am Menschen (Tissue Engineering).

Erfindungsgemäß ist ferner vorgesehen, dass präparierte Zellen menschlichen oder tierischen Ursprungs verwendet werden können. Hierbei kann es sich insbesondere um Fettzellen bzw. verfettete Leberzellen handeln, die in Flüssigkeit aufschwimmen. Selbstverständlich kann das Verfahren auch für pflanzliche Zellen, die in Flüssigkeit aufschwimmen, eingesetzt werden.

Ferner kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass zur Präparation der Zellen Gewebestücke von 20-40 µm eingesetzt werden. Ein derartig kleines Gewebestück kann beim Menschen oder Tier mit einem kleinen Eingriff entnommen werden. Die Entnahme stellt somit eine geringe Belastung für den Spender dar.

Des Weiteren kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass zur Präparation von Zellen aus Gewebe, insbesondere Fettgewebe, dieses zuerst mittels Kollagenase/Dispase im Schüttelbad verdaut wird, anschließend der Verdauungsprozess gestoppt, das Gewebe mit Erythrozytenlysiertpuffer versetzt und die so erlangte Zellsuspension mindestens einmal zentrifugiert und von Restgewebe gereinigt wird.

Auch kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass die Verdauung bei ca. 37 °C über 60 min mittels Kollagenase 0,1 U/ml / Dispase 0,8 U/ml in PBS-Pufferlösung erfolgt. Bei der Kollagenase 0,1 U/ml / Dispase 0,8 U/ml handelt es sich um ein festes Gemisch, das in Pulverform in PBS -phosphate buffer saline- gelöst wird.

Weiter kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass jede Zentrifugierung mit 200xg bei 17°C für 10 min andauert und anschließend der Überstand von sichtbarem weißlichen Gewebe entfernt wird. Bei dem sichtbaren weißlichen Gewebe handelt es sich insbesondere um Bindegewebsstränge und -fasern.

Ferner kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass zur Stopppung des Verdauungsprozesses Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM) mit 15 % Fetal Calf Serum (FCS) zugegeben wird. Hierbei handelt es sich um handelsübliche Produkte verschiedener Produzenten. Das Fetal Calf Serum bewirkt eine bessere biologische Anheftung. Nachteilig ist, dass der Zusatz von FCS eine spätere Differenzierung der Zellen verhindern kann.

Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, dass die Zellen für 12 bis 48 Stunden von der Membran überdeckt werden. Die Membran unterstützt die Anheftung der Zellen an den Boden der Zellkulturschale. Bei menschlichen Fettzellen findet ein Anheften der Zellen an den Boden einer Zellkulturschale nach ca. 24 h statt. Nach dem Auflegen der Membran, z.B. in Form einer perforierten Metallplatte, heften sich die Zellen bevorzugt in solchen Bodenbereichen an, über denen die Metallrandung einer Perforation angeordnet ist.

Weiterhin kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass als sterile Membran ein feinporiges Gitter aus Kunststoff, Keramik oder Metall eingesetzt wird. Selbstverständlich ist auch eine Beschichtung des Gitters vorstellbar, die z.B. während des Auflegens des Gitters auf eine Zellkultur ein mögliches Anheften der Zellen an das Gitter unterbindet.

Ferner kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass eine Membran mit einem Durchmesser der Perforationen von 50 bis 2000 μm verwendet wird. Der Perforationsdurchmesser wird der jeweiligen Zellkultur angepasst. Dabei kann der Perforationsdurchmesser durchaus deutlich größer als der Zelldurchmesser gewählt werden, da nur ein geringfügiger Anteil der Zellen durch die Perforation nach oben treibt. Die meisten Zellen sind durch das Antrocknen mechanisch ausreichend an den Zellkulturboden angehaftet, um ein Auftreiben zu verhindern. Vorstellbar ist, z.B. bei einer Fettzellenkultur mit Zellen, die einen durchschnittlichen Durchmesser von 50-100 μm aufweisen, eine Membran mit einem Perforationsdurchmesser von 1200 μm einzusetzen. Selbstverständlich ist es auch vorstellbar, eine Membran zu wählen, deren Perforationsdurchmesser kleiner als der Zelldurchmesser ist.

Auch kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass die Zellkulturen bei 37 ± 3 °C und 10 ± 3 %CO₂ gelagert werden. Zur Optimierung von Tier- und Pflanzenversuchen müssen diese Standardbedingungen eventuell abgewandelt werden.

5

Des Weiteren kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass als Anheft- bzw. als Promotionsmedium jeweils eine Mischung aus DMEM / Ham-F-12 (Verhältnis 3:1) und 10% FCS verwendet wird.

- 10 Ferner kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass als Anheftmedium ein mit 100 U/ml Penicillin und/oder 100 µg/ml Streptomycin angereichertes Anheftmedium verwendet wird.

- 15 Auch kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass das Anheftmedium durch Absaugung entfernt wird. Das nach Entfernen der Gittermembran abgesaugte Anheftmedium kann zur Rückgewinnung nicht angehefteter Zellen zentrifugiert werden. Die somit gewonnenen Zellen können auf eine neue Zellkulturschale erneut mit etwas Anheftmedium aufgestrichen werden. Anschließend kann das bereits oben geschilderte Verfahren wiederholt und somit die Zellenausbeute deutlich erhöht werden.

20

- Erfindungsgemäß kann auch vorgesehen sein, dass als Promotionsmedium ein mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 ng/ml EGF (= Epidermal Growth Factor) angereichertes Promotionsmedium verwendet wird. Der Epidermal Growth Factor unterstützt die Delipidierung und Teilung der Zellen. Er könnte gegebenenfalls auch bereits dem Anheftmedium zugesetzt werden, so dass nur mit einem Medium gearbeitet werden müsste. Der Epidermal Growth Factor (EGF) würde dabei aber u.U. das Anheften der Zellen an den Boden der Zellkulturschale negativ beeinflussen.

25

- 30 Im Folgenden soll das erfindungsgemäße Verfahren anhand eines Beispiels mit menschlichem Fettgewebe erläutert werden:

1. In einer Sterilbank wird das Bindegewebe unter Lupenbrillenoptik (2,5fach) von dem Fettgewebe getrennt.
2. Das Fettgewebe wird der Sterilbank entnommen und in kleine Stücke von jeweils
5 20–40 mg zerlegt.
3. Das Fettgewebe wird mittels Kollagenase 0,1 U/ml / Dispase 0,8 U/ml bei 37 °C über 60 min in PBS-Pufferlösung im Schüttelbad verdaut. Bei der Kollagenase 0,1 U/ml / Dispase 0,8 U/ml handelt es sich um ein festes Gemisch, das in Pulver-
10 form in PBS –phosphate buffer saline- gelöst wird.
4. Der Verdauungsprozess wird durch die Zugabe von Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) mit 15% Fetal Calf Serum (FCS) gestoppt.
- 15 5. Das übergebliebene Gewebe wird für eine Einwirkdauer von 10 min mit Erythrozytenlysierpuffer (154 mmol/l NH₄Cl, 10 mmol/l KHCO₃, 1 mmol/l EDTA (=Ethylendinitrilotetraacetat)) versetzt. Hiermit werden Erythrozyten aufgelöst, die ansonsten die Anheftung der Zellen stören würden.
- 20 6. Die so erlangte Zellsuspension wird mit 200 x g bei 17°C für 10 min zentrifugiert.
7. In der Zellsuspension noch vorhandenes sichtbares weißliches Gewebe, das insbesondere Bindegewebsstränge und -fasern enthält, wird entfernt, indem der Überstand durch ein steriles Gitter mit 400µm Porengröße gestrichen wird.
25
8. Die Zellsuspension wird nun erneut mit 200 x g bei 17°C für 10 min zentrifugiert.
9. Die derart präparierten Zellen werden unter dem Sterilabzug auf den Boden einer handelsüblichen Zellkulturschale (63,6 cm²) mit ein wenig Anheftmedium als
30 Verteilungshilfe verstrichen. Dabei beträgt das Verhältnis Anheftmedium:Zellen ca. 1:1. Der Boden der handelsüblichen Zellkulturschale ist für das Anheften vom Hersteller speziell präpariert. Die Zellkulturschale wird in der Sterilbank belassen.

10. Nachdem die Flüssigkeit zunehmend verdunstet ist und die Zellen mechanisch am Boden der Kulturschale anhaften, kann eine sterile Gittermembran in Form eines Lochblechs aufgelegt werden. Der Durchmesser der Löcher der Gittermembran beträgt ca. 1200 µm. Ohne das mechanische Anhaften würden die reifen Fettzellen (Adipozyten) durch den großen zytoplasmatischen Lipidtropfen schwimmen und keinen Kontakt zum Kulturboden bekommen („Bouilloneffekt“).
11. Der mit Zellen behaftete Boden der Kulturschale wird mit einem Anheftmedium überschichtet. Für das Anheften werden bei einer Zellkulturplatte mit einer Bodenfläche von 62 cm² ca. 7 ml Anheftmedium benötigt. Das Anheftmedium weist folgende Zusammensetzung auf: eine Mischung aus DMEM / Ham-F-12 (Verhältnis 3:1) und 10% FCS. Das Anheftmedium ist angereichert mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Aussaatdichte auf dem Boden der Kulturschale beträgt 30.000 bis 60.000 Zellen/cm².
12. Die Kulturschale samt Membran wird in einem Kulturschrank bei 37°C und 10 %CO₂ verwahrt. Nach ca. 24 h heften sich die unter der Gittermembran angeordneten lipidgefüllten Fettzellen an dem Kulturschalenboden biologisch an. Dabei heften sie sich insbesondere gerne an den Kulturbodenbereichen an, die unterhalb der Porenbegrenzungen der Membran liegen.
13. Nach ca. 24 h wird die Kulturschale dem Kulturschrank entnommen und die Gittermembran entfernt.
14. Das nach Entfernen der Gittermembran abgesaugte Medium kann erneut zentrifugiert werden und das Verfahren ab Schritt 6 erneut durchgeführt werden. Dadurch werden Zellen, die sich im ersten Durchgang nicht am Boden der Kulturschale angeheftet haben, erneut ausgesät. Die Zellenausbeute kann dadurch erhöht werden.
- Die somit erlangte Zellkultur kann für pharmazeutische Untersuchungen, z.B. Stoffwechseluntersuchungen an Einzelzellen, eingesetzt werden. Z.B. kann die Reaktion

einzelner Zellen auf bestimmte pharmazeutische Substanzen, z.B. Insulin, untersucht werden. Insbesondere Tierversuche können somit eingeschränkt werden.

Es ist jedoch auch möglich die Zellkultur in weiteren Verfahrensschritten, die im Folgenden geschildert werden, zur Delipidierung und Teilung anzuregen:

1. Das Anheftmedium wird hierzu abgesogen und der Boden der Kulturschale mit einem Promotionsmedium überschichtet. Das Promotionsmedium ist replikations- und wachstumsfördernd. Das Promotionsmedium weist folgende Zusammensetzung auf: eine Mischung aus DMEM / Ham-F-12 (Verhältnis 3:1) und 10% FCS. Das Promotionsmedium ist angereichert mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10ng/ml EGF (= epidermal growth factor).
2. Innerhalb weniger Tage, z.B. innerhalb von 5 Tagen, beginnen die Zellen die zytoplasmatischen Lipide zu verlieren, d.h. die Zellen delipidieren. Nach erfolgreicher Delipidierung, d.h., nach ca. 5 bis 20 d, beginnen die delipidierten Zellen sich zu teilen.
3. Durch die Zugabe von Insulin und/oder Steroidhormon ist es bei Bedarf möglich, die delipidierten Zellen wieder zur Fettaufnahme anzuregen.

Mittels dieses Verfahrens können nun aus einem ursprünglich sehr kleinen, z.B. nur erbsengroßen Bindegewebsstück eines Spenders große Mengen an Zellen gewonnen werden. Diese können zum Ausgleich von Weichteildefekten (Tissue-Engineering), z.B. nach Unfällen, an die betroffene Körperstelle zum Auffüllen des Defektes dem Spender selbst rückverpflanzt werden.

Ansprüche

1. Verfahren zur Kultivierung von aus Gewebe präparierten lebenden Zellen, die in Flüssigkeit aufschwimmen, insbesondere reifen Fettzellen,
5 **dadurch gekennzeichnet,**
dass die Zellen zuerst zusammen mit einem flüssigen Anheftmedium als Verteilungshilfe auf den Zellkulturboden einer Zellkulturschale aufgebracht werden, an dem sie mit zunehmender Verdunstung des Anheftmediums mechanisch anhaften, und
10 dass dann die Zellen mit dem Anheftmedium überschichtet und mindestens 12 h bei Standardbedingungen für Zellkulturen gelagert werden, währenddessen sich zumindest einige Zellen biologisch auf dem Zellkulturboden anheften.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass vor dem Über-
15 schichten mit Anheftmedium die Zellen mit einer perforierten Membran überdeckt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass im Anschluß an die Lagerung bei Standardbedingungen für Zellkulturen das Anheftme-
20 dium entfernt und die Kulturschale mit einem Promotionsmedium mehrtägig überschichtet wird, währenddessen zumindest einige Zellen delipidieren und sich teilen.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die präparierten Zellen menschlichen oder tierischen Ursprungs
25 sind.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Präparation der Zellen Gewebestücke von 20-40 mg eingesetzt werden.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Präparation von Zellen aus Gewebe, insbesondere Fettgewebe, dieses zuerst mittels Kollagenase/Dispase im Schüttelbad verdaut wird, anschließend der Verdauungsprozess gestoppt, das Gewebe mit Erythrozytenlyse-
5 puffer versetzt und die so erlangte Zellsuspension mindestens einmal zentrifugiert und von Restgewebe gereinigt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Verdauung bei ca. 37 °C über 60 min mittels Kollagenase 0,1 U/ml / Dispase 0,8 U/ml in
10 PBS-Pufferlösung erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass jede Zentrifugierung mit 200 x g bei 17°C für 10 min andauert und anschließend der Überstand von sichtbarem weißlichen Gewebe entfernt wird.
15
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass zur Stoppung des Verdauungsprozesses Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM) mit 15 % Fetal Calf Serum (FCS) zugegeben wird.
- 20 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen für 12 bis 48 Stunden von der Membran überdeckt werden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass als sterile Membran ein feinporiges Gitter aus Kunststoff, Keramik oder
25 Metall eingesetzt wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass eine Membran mit einem Durchmesser der Perforationen von 50 bis 2000 µm verwendet wird.
30
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellkulturen bei 37 ±3 °C und 10 ±3 %CO₂ gelagert werden.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Anheftmedium bzw. als Promotionsmedium jeweils eine Mischung aus DMEM / Ham-F-12 (Verhältnis 3:1) und 10% FCS verwendet wird.
- 5
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Anheftmedium ein mit 100 U/ml Penicillin und/oder 100 µg/ml Streptomycin angereichertes Anheftmedium verwendet wird.
- 10
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Anheftmedium durch Absaugung entfernt wird.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass als Promotionsmedium ein mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 ng/ml EGF (= Epidermal Growth Factor) angereichertes Promotionsmedium verwendet wird.
- 15